

REC'D 13 MAR 2000

PCT

OFICINA ESPAÑOLA

de

PATENTES y MARCAS**CERTIFICADO OFICIAL**

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9900182, presentada en este Organismo, con fecha 25 de Enero de 1999.

Madrid, 3 de marzo de 2000

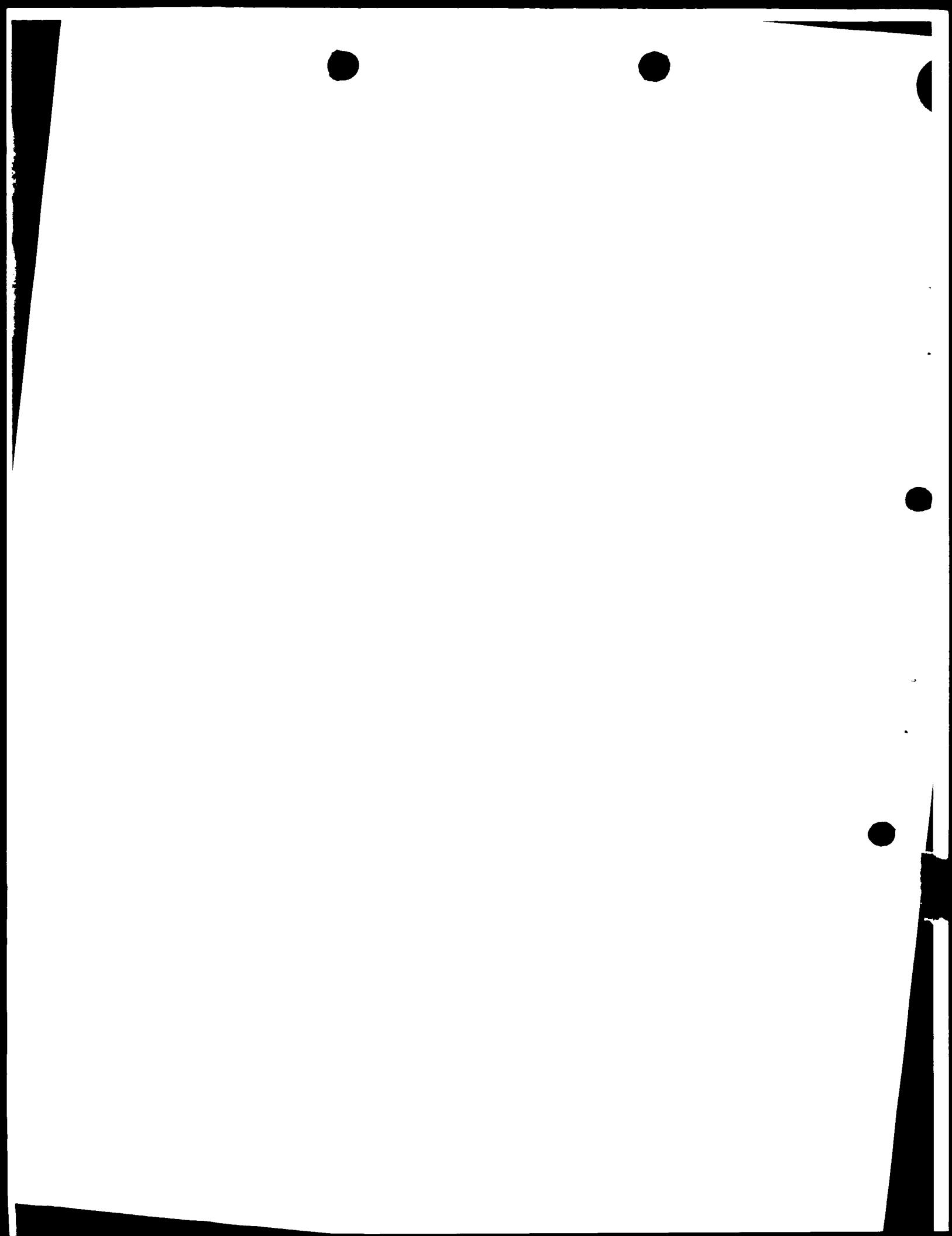
El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

M. MADRUGA

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)





OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y
MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

(1) SOLICITUD DE ADICION
 SOLICITUD DIVISIONAL
 CAMBIO DE MODALIDAD
 TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA

(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN
MODALIDAD
NUMERO SOLICITUD
FECHA SOLICITUD

MODALIDAD
NUMERO SOLICITUD
FECHA SOLICITUD

(4) SOLICITANTE(S) APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA

ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS CENTRUM, S.A.

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO SAGITARIO, 14

LOCALIDAD ALICANTE

PROVINCIA ALICANTE

PAIS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑA

(6) INVENTOR(ES)

EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR
 EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR

(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO

INVENC. LABORAL CONTRATO SUCESION

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

COD. NACION

QUINTANILLA ALMAGRO
DIAZ ALPERI

ELISEO
JOAQUIN

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

ES
ES

(9) TITULO DE LA INVENCION

UNA COMPOSICION FARMACEUTICA CON ACTIVIDAD REGULADORA DE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS DE ADHESION

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.

SI NO

(11) EXPOSICIONES OFICIALES

LUGAR

FECHA

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAIS DE ORIGEN

COD. PAIS

NUMERO

FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.

SI NO

(14) REPRESENTANTE APELLIDOS

NOMBRE

CODIGO

DOMICILIO

LOCALIDAD

PROVINCIA

COD. POSTAL

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN

DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS. 44
 REIVINDICACIONES N.º DE PAGINAS. 1
 DIBUJOS. N.º DE PAGINAS.
 RESUMEN
 DOCUMENTO DE PRIORIDAD
 TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

DOCUMENTO DE REPRESENTACION
 PRUEBAS
 JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS
 HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS
 OTROS

FIRMA DEL FUNCIONARIO

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión, para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, mas los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

ELMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

N.º DE SOLICITUD

IMP 182

FECHA Y HORA DE LA PRESENTACION EN O.E.P.M.
Registro Espacial

Fecha 25 ENE. 1999

FECHA Y HORA DE LA PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

ENTRADA 650 - 1305

(3) LUGAR DE PRESENTACION CODIGO

11

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Dpto. SECRETARIA GENERAL
Panamá, 1. Marzo 2007

TELEFONO 965288160

03006

CODIGO POSTAL

ES

CODIGO PAIS

ES

CODIGO NACION

ES



| | | | | | |
|-------------|--------------------|--|--|-------------------------------------|---------------------------|
| (31) NUMERO | DATOS DE PRIORIDAD | | (33) PAIS | A1 | (12) PATENTE DE INVENCION |
| | | | (32) FECHA | (21) NUMERO DE SOLICITUD 9900182 | |
| | | | (22) FECHA DE PRESENTACION 25-01-99 | | |

(71) SOLICITANTE(S)
ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS CENTRUM, S.A.

NACIONALIDAD

ESPAÑA

DOMICILIO
SAGITARIO, 14/03006/ALICANTE/ALICANTE/ESPAÑA

(72) INVENTOR(ES)
ELISEO QUINTANILLA ALMAGRO, JOAQUIN DIAZ ALPERI

(73) TITULAR(ES)
ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS CENTRUM, S.A.

| | | | |
|-------------------------|---------------------------|---|---|
| (11) N.º DE PUBLICACION | (45) FECHA DE PUBLICACION | (62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA | GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN) |
|-------------------------|---------------------------|---|---|

(51) Int. Cl.

(54) TITULO

UNA COMPOSICION FARMACEUTICA CON ACTIVIDAD
REGULADORA DE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS DE
ADHESION

(57) RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA SIN VALOR JURIDICO)

Una composición farmacéutica con actividad reguladora de la expresión de las moléculas de adhesión y poblaciones linfocitarias y su aplicación como agente antiinflamatorio. Esta composición farmacéutica contiene como principio activo el Anapsos, un extracto hidrosoluble y un extracto liposoluble de los rizomas de Polypodium, junto con excipientes aceptables.

TITULO DE LA INVENCIÓN

5 Una composición farmacéutica con actividad reguladora de la expresión de las moléculas de adhesión.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención describe un nuevo uso farmacológico del Anapsos, un extracto natural del *Polypodium* compuesto por 118 miligramos de extracto hidrosoluble y 2 miligramos de fracción liposoluble.

15 La presente invención describe la acción del Anapsos en la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión - reduciendo la expresión de la cadena alfa de las integrinas β -2 (CD11a y CD11b) , la cadena beta de las integrinas β -2 (CD18) y el antígeno de diferenciación CD54 de la superfamilia de las inmunoglobulinas y normalizando las alteraciones del fenotipo inmunológico - y su utilización en cualquiera de las enfermedades en las que un exceso de inflamación sea responsable de los síntomas y 20 signos derivados de la lesión celular y tisular que acontece en dichas patologías.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR A LA INVENCIÓN

25 Para que las células del sistema inmune puedan realizar eficazmente su función, requieren mantener contactos con otras células o con la matriz extracelular, reconociendo la situación de su entorno. Por ello los leucocitos no sólo poseen en su superficie receptores específicos y que pueden activarse de forma específica en respuesta a determinados estímulos, sino que también expresan una serie de moléculas que se 30 engloban bajo la denominación de moléculas de adhesión. Estas moléculas leucocitarias van a actuar como receptores de ligandos que están ubicados en otras células, actuando en este caso como contrarreceptores de secuencias de aminoácidos presentes en diferentes proteínas de la matriz celular, como el colágeno, la fibronectina, la láminina y otras. Las moléculas de adhesión además de permitir o favorecer la unión célula-célula o

célula- matriz extracelular, colaboran en la activación celular enviando señales coactivadoras al interior de la célula.

5 La migración de leucocitos a los tejidos, esencial en la respuesta inflamatoria, tiene lugar a través de una serie de interacciones moleculares, entre las cuales las moléculas de adhesión juegan un papel fundamental; según su estructura las moléculas de adhesión pueden clasificarse en 3 grandes categorías:

10 - Las selectinas
- Las que pertenecen a la familia de las integrinas
- Las que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas

15 La primera etapa en el fenómeno inflamatorio es el rodamiento de los leucocitos sobre la pared endotelial, que da lugar a la marginación de los mismos. Este proceso inicial de marginación, está mediado por la interacción entre determinadas selectinas de endotelio (selectina E y P) y su contra- receptor en el leucocito (sLex) y entre la selectina L del leucocito y determinadas adhesiones del endotelio. A su vez, se induce la expresión de las moléculas de adhesión junto a la liberación de las citocinas proinflamatorias. A 20 continuación, una señal de activación induce un cambio conformacional en los dominios extracelulares de las integrinas leucocitorias, dando lugar a una adhesión más firme, mediada por interacciones entre determinadas integrinas y sus ligandos (LFA-1/ICAM-1, VLA-4/VCAM-1). Como consecuencia de la adhesión leucocito/endotelio, se detiene el rodamiento de los leucocitos y se produce la extravasación y salida de los leucocitos 25 desde el torrente sanguíneo al foco inflamatorio, por quimiotaxis. Las integrinas pues, son moléculas responsables de diferentes procesos de adhesión, mediando la adhesión definitiva al endotelio, la extravasación y la migración hacia los focos inflamatorios.

30 Las cadenas alfa y beta de las integrinas β -2 (CD11a, CD11b, CD18) están ampliamente extendidas en todos los tejidos por lo que una disminución de su expresión conlleva un efecto antiinflamatorio en estos tejidos. La molécula de adhesión CD54 perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas se encuentra del mismo modo ampliamente distribuida por diversos tejidos tales como endotelio, leucocitos ,etc.

En pacientes con esclerosis múltiple se ha observado un aumento de la población linfocitaria CD4+CD29+CD45RA, así los últimos datos de la literatura sobre células naïve y de memoria, apoyan un papel fundamental de las células 5 “CD4+CD29+CD45RA+ revertant” como las auténticas células de memoria, con vida media más larga que las CD45RO+ y capaces una vez sensibilizadas de permanecer años en el organismo.

La inflamación, si bien suele ser un proceso fisiológico, cuando es llevado a un extremo 10 puede convertirse en algo patológico. Esto es lo que ocurre por ejemplo en la mayor parte de los procesos autoinmunes (sistémicas u organoespecíficas), enfermedades inflamatorias crónicas o infecciosas cuyos síntomas vienen marcados por una inflamación exagerada que es responsable del daño originado a órganos y tejidos. Así cualquier fármaco que sea capaz de disminuir la expresión de moléculas de adhesión en 15 los procesos en los que habitualmente hay un aumento de expresión de las mismas, puede ser útil en el tratamiento de estos, sea cual sea su etiopatogenia: trastornos neurodegenerativos (esclerosis múltiple, Alzheimer), enfermedades del tejido conectivo (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, enfermedad de Behçet, etc).

20 La acción antiinflamatoria debido a reducción de la expresión de las moléculas de adhesión se ejerce de forma independiente a la inhibición-estimulación de las citocinas inflamatorias y al efecto estimulante sobre la inmunidad celular (incremento de la citocinas TH1-like e incremento de linfocitos T CD8+ y células NK).

25 Los extractos del género de las Polipodáceas han sido utilizados tradicionalmente en Centro América en la medicina popular atribuyéndoles diferentes actividades tales como: actividad antiinflamatoria, **Boletín de la Sociedad Química del Perú pag 91 (1988)**; prevención de tumores malignos, **Nature 214: 1256-1258 (1967)**. Se han descrito efectos clínicos en enfermedades relacionadas con los déficit inmunológicos, tales como 30 dermatitis atópica; **Dermatológica 173: 154-156 (1986)**; dermatitis atópica, **Allergology et Inmunopathology 15: 185-189 (1987)**; **International Journal of Dermatology 13: 276-282 (1974)**; **Planta Médica 58: 306-310 (1992)** y vitílico, **International Journal of Dermatology 28: 479 (1989)**. En estas publicaciones se ha encontrado que los extractos

de *Polypodium leucotomos* han tenido acción en la hiperqueratosis, paraquerotosis, mitosis epidérmica y lesiones de la epidermis.

5 Los extractos de estos helechos han tenido capacidad inmunomoduladora en pacientes con dermatitis atópica, con una normalización de la relación CD4+/CD8+ después de tratamiento de extracto de *Polypodium leucotomos* (Anapsos®), *Dermatológica* 173: 154-56 (1986); *Annals Inmuno* 134: 393-400 (1983). *Annals of Psychiatry* 3: 329-341 (1992) describen que el Anapsos® mejora el aprendizaje, disminuye los niveles de 10 citocinas IL-1 β -2 y IL-2 en la corteza frontoparietal y disminuye la IL-1 β en el hipocampo., *Br. J. Clin. Pharmacol* 43: 85-89 (1997) describe el efecto inmunomodulador in vitro del extracto polar del *Polypodium leucotomos* (Anapsos®) sobre las citocinas IL-1 β -IL-2-IL-10-INF- γ lo cual podría tener un efecto pleiotrópico en las diferentes poblaciones del sistema inmune.

15 Respecto a la literatura de patentes se han recuperado los documentos que a continuación se referencian.

La solicitud de patente europea **EP-503.208** describe un procedimiento para la obtención 20 de un extracto hidrosoluble por extracción de las hojas y/o rizomas de diversos helechos. Este documento especifica que dichos extractos presentan actividad inmunológica y así son de utilidad en las enfermedades con una depresión del sistema inmune generalmente con un déficit de linfocitos T supresores y con efectos beneficiosos en las enfermedades autoinmunes e infecciones virales y su utilización en patologías tales como: Artritis 25 reumatoide, lupus eritematoso, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, hepatitis B, síndrome de Di George, anemia autohemolítica, dermatitis atópica, psoriasis, enfermedad de Basedow, enfermedad de Chron, mistenia, vitílico, herpes zoster, etc; aumentándose los linfocitos T supresores.

30 La patente española **ES-2.088.770** nos enseñan una composición farmacéutica basada en una fracción hidrosoluble y una fracción liposoluble de las hojas y/o los rizomas de diversos helechos con efectos beneficiosos en las disfunciones cognitivas, y/o neuroinmunes, especialmente en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

La patente **US-5.614.197** describe la utilización de los extractos de *Polypodium* como agentes fotoprotectores y antioxidantes. La patente española **ES-470.204** se refiere a la obtención de terpenos naturales con actividad antipsoriática obtenidos por la extracción

5 de los rizomas y hojas de diversos helechos. La patente española **ES-490.293** se refiere a un medicamento con efectos antiinflamatorios en problemas patológicos que afecten al aparato osteolocomotor del organismo humano, especialmente las artritis, a partir de extractos de helechos de la familia Polypodacea utilizando tanto sus hojas como sus rizomas. La patente **US-3.839.553** usa los extractos de *Polypodium* como

10 acondicionadores capilares. La patente francesa **FR-2.395.266** está relacionada con la obtención de una α -d-gluco-octano-delta-lactona-eno-diol y su sal cálcica a partir de los helechos de *Polypodium*, teniendo actividad como agente inmunosupresor y antiviral en mamíferos.

15 La solicitud de patente con número de publicación **WO-97/40838** detalla la utilización de un sulfolípido en el tratamiento de los trastornos inflamatorios de la piel, especialmente en la psoriasis, mediante la inhibición del factor de agregación plaquetaria, siendo obtenido el sulfolípido a partir de las hojas por extracción con metanol.

20 Los extractos de *Polypodium* descritos en el Estado de la técnica son extractos hidrosolubles o hidrofílicos los cuales pueden obtenerse por extracción con disolventes polares seguidos de diferentes pasos de purificación como purificación por resinas intercambiadoras de iones, adsorción sobre carbón activo y posterior evaporación del

25 disolvente o liofilización. Así mismo, las fracciones lipídicas o liposolubles se pueden obtener por extracción con disolventes apolares tales como hexano, cloroformo, éter, obteniéndose los diferentes triterpenos presentes en las hojas y/o rizomas. La composición farmacéutica de esta invención contiene como principio activo el extracto de *Polypodium*, Anapsos, siendo esta composición farmacéutica la descrita en la patente

30 española **ES-2.088.770**, compuesta por una fracción hidrosoluble y una fracción liposoluble y vehículos farmacéuticos aceptables, conteniendo cada dosis unitaria 120 mg de extracto que corresponde a 118 mg de fracción hidrosoluble, equivalente a 60 mg de extracto alcohólico y 2 mg de fracción liposoluble.

Los excipientes utilizados son de uso habitual en la industria farmacéutica, siendo en esta preparación lactosa, almidón, estearato de magnesio y dióxido de silicio, pudiéndose emplear otros excipientes y en otras proporciones.

5

El extracto hidrosoluble se obtiene por maceración en agua durante 24-48 horas de los rizomas y hojas de los helechos *Polypodium aureum*, *Polypodium leucotomos*, *Polypodium vulgare*, *Polypodium trisereiale*, *Pteridium aquilinum*, *Drypteris crassirhizoma* y *Cyathe taiwamiana*; caracterizándose dicha fracción hidrosoluble por la presencia de ácido quínico, ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fumárico y por la ausencia de cualquier sulfolípido. La fracción liposoluble está caracterizada por la presencia de *Neohop-13(18)-eno*, *Fern-9-(11)-eno* y *Hop-(22)-29-eno* identificados mediante espectrometría de masas.

10

15 En los documentos que componen el Estado de la Técnica se describen distintas actividades, a veces de una forma empírica sin detallar el mecanismo, de los extractos polares y apolares de los rizomas y/o hojas de los helechos pertenecientes a la familia de las Polipodáceas.

20

Las acciones farmacológicas se podrían resumir en:

-Actividad inmunomoduladora en las enfermedades con déficit de linfocitos T supresores, infecciosas y autoinmunes, mostrando los extractos efecto pleiotrópico sobre las distintas poblaciones de citocinas,

25

-Actividad colagenopoyética y aplicación en psoriasis, dermatitis atópica

-Actividad antiinflamatoria del aparato osteolocomotor, principalmente la artritis.

-Actividad antiinflamatoria caracterizada por la inhibición del factor de agregación plaquetaria.

30

En ningún documento recuperado se ha demostrado la acción de los extractos de los diferentes helechos sobre la regulación de las moléculas de adhesión ni sobre las poblaciones linfocitarias $CD4+CD29+CD45RA+$ que se hayan aumentada en los pacientes con esclerosis múltiple.

OBJETIVO DE LA INVENCIÓN

La presente invención desarrolla una nueva aplicación terapéutica del Anapsos basada en
5 la regulación de los distintos mediadores celulares. La regulación de la expresión de las moléculas de adhesión(la disminución de expresión de las cadenas de integrinas e superfamilia de las inmunoglobulinas)y la normalización de la población linfocitaria CD4+CD29+CD45 RA+ ,hace del Anapsos un fármaco adecuado por cualquier enfermedad que presente un proceso inflamatorio sea cual sea su etiopatogenia, en
10 especial en la esclerosis múltiple.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15 El Anapsos (118 miligramos de extracto hidrosoluble y 2 miligramos de la fracción liposoluble de *Polypodium*) ha mostrado un efecto regulador sobre la expresión de las moléculas de adhesión, en las células mononucleares de sangre periférica de humanos sanos, tanto in vivo como in vitro. El Anapsos ha demostrado una capacidad similar a la azatioprina para revertir a la normalidad la población linfocitaria CD4+CD29+CD45RA+
20 que se halla aumentada en los pacientes con esclerosis múltiple observándose una estabilización de los pacientes.

A dosis entre 0 - 5000 µg/ml de Anapsos y utilizando diferentes dosis de fitohemaglutinina, el Anapsos in vitro es capaz de inhibir el aumento de la expresión de
25 las moléculas de adhesión (CD54 y CD11b) inducido por la fitohematoglutinina en estudios realizados sobre células mononucleares de sangre periférica humana, siendo los resultados más significativos a dosis de 150 µg/ml de Anapsos y 10 µg/ ml de fitohemaglutinina.

30 Tras la administración de 720 miligramos de extracto por día durante 11 días en humanos, el Anapsos disminuyó el porcentaje de las poblaciones linfoideas CD11a, CD11b y CD54. El extracto por tanto inhibe la expresión de determinadas moléculas de adhesión de las integrinas β2 (CD11a, CD11b) y de la superfamilia de las inmunoglobulinas (CD 54).

Así, aparte de la acción estimulante sobre la Inmunidad celular ejercida por las citocinas y su acción inmunomoduladora descritas por el Estado de la Técnica, el Anapsos posee una fuerte capacidad antiinflamatoria, similar a la fenilbutazona, utilizada como control en estudios de actividad antiinflamatoria en ratones, no estando relacionados directamente la regulación de las moléculas de adhesión con sus efectos antiinflamatorios.

En estudios clínicos realizados en humanos la composición farmacéutica a base de extractos hidrosolubles y liposolubles de *Polypodium* ha mostrado ser eficaz algunas enfermedades en las que existe un proceso inflamatorio por ejemplo esclerosis múltiple, prostatitis, faringitis, teniendo estas enfermedades una etiopatogenia diferente entre sí.

La invención se describe ahora por medio de los ejemplos siguientes, no siendo limitativos del alcance de la invención.

Ejemplo 1. - Estudio de la capacidad antiinflamatoria

Material.-

- 20 - Ratas WISTAR hembras de 150 ± 15 g
- Pletismómetro LETICA
- Balanza METTLER AJ 100
- Balanza COBOS D 600
- Fenilbutazona
- 25 - DIFCO
- CMC y Tween 80

Método.-

Se ha llevado a cabo un estudio de la actividad antiinflamatoria, en fase aguda y crónica, siguiendo el método descrito por Mizushima en ratas. El fármaco de referencia (fenilbutazona, dosis de 80 mg/Kg) y los productos problema (a dosis equivalentes a 1,25 g de extracto por Kg de peso de animal) son disueltos en una solución al 1% de CMC (carboximetilcelulosa) en agua destilada (p/v) y Tween 80: agua destilada (0,2: 3,3 - v/v), para su administración por vía oral.

Seis días después de la inoculación, por vía intradérmica de 0,1 mL del adyuvante completo de Freund (DIFCO) en la parte basal de la cola, se inyectan 0,1 mL de una suspensión de carragenina tipo IV al 2% (p/v) en la aponeurosis plantar de la pata posterior izquierda.

El volumen de la pata del animal se realiza inmediatamente antes de la inyección de carragenina (volumen basal) y posteriormente a las 3, 5 y 7 horas (fase aguda de la inflamación) y a las 24, 48, 72 y 96 horas (fase crónica de la inflamación), mediante un 10 pletismómetro de agua.

Los productos en estudio, la fenilbutazona y el vehículo se administran, por vía oral, a lotes de 6 animales, 1 hora antes de la inyección de carregenia y a las 24, 48 y 72 horas.

15 Resultados.-

El porcentaje de inhibición de la inflamación se calcula comparando el incremento de volumen de la pata del animal con respecto a su volumen basal, para cada grupo de animales en relación con el grupo control, al que se ha administrado el vehículo de la fenilbutazona y los productos en estudio. La significación estadística es evaluada 20 mediante el test de la T de Student, los resultados obtenidos se detallan a continuación.

| % INHIBICIÓN DE LA INFLAMACION | | | | | | | |
|--------------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| | 3 h | 5 h | 7 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| Control | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Fenilbutazona | 41% | 27% | 21% | 36% | 60% | 56% | 40% |
| Anapsos | 29% | 35% | 41% | 43% | 50% | 54% | 48% |

Los resultados muestran que el extracto de Polypodium manifiesta una actividad inhibitoria del proceso de inflamación, superando al control en la fase aguda de 25 inflamación y teniendo una actividad similar a la fenilbutazona en la fase aguda.

Ejemplo 2. - Estudios clínicos sobre la respuesta del Anapsos en diferentes patologías:

5 - Esclerosis múltiple: En un estudio realizado en pacientes con esclerosis múltiple, a lo largo de un año de tratamiento con 720 mg de extracto/día, resultó útil para corregir las alteraciones del fenotipo inmunológico más característico de esta enfermedad, coincidiendo a la vez con una estabilización clínica de los pacientes y regulándose la población linfocitaria CD4+CD29+CD45RA+.

10 - Prostatitis. Tras tres días de tratamiento con dosis de 240 mg de extracto, 60 minutos antes de las comidas principales, se observa una mejoría en los pacientes desapareciendo todos los síntomas.

15 - Faringitis. Con dosis de 120 mg de extracto muestra efectos favorables en los problemas faríngeos, especialmente en faringitis en período subagudo.

Ejemplo 3. - Estudio in vitro de las moléculas de adhesión en células mononucleares en sangre periférica. PBMCs.

Se extrajo sangre periférica de 10 individuos sanos y se separaron las células mononucleares mediante centrifugación por gradientes de densidad con Fycoll-Hypaque. Las células se cultivaron en placas microtiter de fondo plano, a razón de 1 millón/ml

25 durante 48 horas en estufa de CO₂, con fitohemaglutinina (PHA) a las concentraciones de 0, 0.5, 2, 5 y 10 µg/ml y/o con Anapsos concentraciones entre 0 y 5000 µg/ml.

Finalizado el cultivo, los linfocitos se analizaron por citometría de flujo; se estudió la expresión de determinadas moléculas de adhesión (CD11a, CD11b, CD18, CD54) para las diferentes condiciones de estimulación. En paralelo con el cultivo anterior, se realizó un cultivo de 5 días de duración y en las mismas condiciones de estimulación. Diecisésis horas antes de finalizar el cultivo, se añadió timidina tritiada. Terminado el cultivo se

lavaron las células con el Harvester y se les incorporó el líquido de centelleo. La incorporación celular de timidina tritiada se valoró mediante un contador β . Durante el

5 cultivo, se fotografiaron las células mediante un microscopio invertido. Los resultados se muestran a continuación.

Expresión in vitro de distintas moléculas de adhesión en células mononucleares en sangre periférica.

| 10 | N= 10 | CD11a | CD11b | CD18 | CD54 | |
|----|---------|-------|-------|------|------|--|
| | PHA10 | 22% | 35% | 27% | 9% | |
| | ANP 150 | 15% | 14% | 19% | 0% | |
| | PHA+ANP | 16% | 23% | 25% | 3% | |
| | CONTROL | 17% | 20% | 20% | 2% | |

15

Ejemplo 4. - Expresión in vivo de las moléculas de adhesión en células mononucleares en sangre periférica. PBMNc.

20 Un total de 10 personas voluntarias sanas tomaron durante 11 días consecutivos 720 mg/día de Anapsos. A todos ellos se les extrajo sangre periférica el día anterior de comenzar la medicación, al día siguiente del inicio, al cuarto día y tras la última toma. Se separaron las células mononucleares mediante centrifugación por gradientes de densidad con Fycoll-Hyapque y se analizaron distintas poblaciones linfoides de acuerdo 25 con la expresión o no de los siguientes marcadores de diferenciación CD11a y CD 11b. Los resultados son los siguientes:

Expresión in vivo de las moléculas de adhesión en células mononucleares en sangre periférica. PBMNc.

30

| N= 10 | PRE | 24H | 72H | 96H | RETIRADA |
|-------|-----|-----|-----|-----|----------|
| CD11b | 13% | 4% | 2% | 1% | 12% |
| CD11a | 14% | 6% | 3% | 1% | 15% |

REIVINDICACIONES

5 1.- Utilización del Anapsos, un extracto natural aislado de los rizomas de *Polypodium*, compuesto por una fracción hidrosoluble y una fracción liposoluble junto a un vehículo farmacéuticamente aceptable para la fabricación de una composición farmacéutica reguladora de la expresión de las moléculas de adhesión.

10 2.- Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 1 donde la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión está caracterizada por la reducción de la expresión de las cadenas alfa de la integrina β -2 y/o las cadenas beta de integrina β -2.

15 3.- Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 1 donde la regulación de la expresión de la molécula de adhesión está caracterizada por la reducción de la expresión del CD54.

20 4.- Utilización de la composición farmacéutica según la reivindicación 1 como agente antiinflamatorio caracterizado por su capacidad reductora de la expresión de las moléculas de adhesión.

25 5.- Utilización del Anapsos, un extracto natural aislado de los rizomas de *Polypodium* compuesto por una fracción hidrosoluble y una fracción liposoluble junto a un vehículo farmacéuticamente aceptable para la fabricación de una composición farmacéutica para normalizar las poblaciones linfocitarias CD4+CD29+CD45RA+ en las patologías con dicha población aumentada.

6.- Utilización de la composición farmacéutica según la reivindicación 4 donde la patología es la esclerosis múltiple.